

Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave**

Composition of the culture medium and incubation for rooting shoots of *Agave*

Maura Elisama Miguel Luna¹, José Raymundo Enríquez-del Valle^{1§}, Vicente Arturo Velasco Velasco¹, Yuri Villegas Aparicio¹, José Cruz Carrillo Rodríguez¹ y Gerardo Rodríguez Ortiz¹

¹Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230. Tel. y Fax: (01951) 5170788, 5170444. (lunitastar.mar@hotmail.com; vicvel5@hotmail.com; yurivil37@yahoo.com; jcarrillo_rodriguez@hotmail.com; grodriguezortiz@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: jenriquezdelvalle@yahoo.com.

Resumen

En Oaxaca el *Agave americana* variedad oaxacensis se encuentra en estado silvestre y pequeñas plantaciones. El objetivo de la investigación fue evaluar la concentración del ácido indolbutírico (AIB) y las sales inorgánicas en el medio de cultivo, así como el ambiente de incubación, en su efecto sobre el enraizado de brotes de *Agave* y características de las plantas. Se trabajó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y un invernadero del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca en el periodo 2011-2012. Tejidos de tallo cultivados *in vitro* formaron racimos de 4 a 10 brotes adventicios. Los brotes con 4-4.5 cm se separaron individualmente y para inducir su enraizado, se transfirieron a recipientes de 145 cm³ con 20 mL de diferentes medios de cultivo. El total de brotes en cada medio de cultivo se separaron en dos grupos para incubarlos durante 60 días en condiciones diferentes: laboratorio o invernadero. Todos los brotes formaron raíces adventicias aun en medios de cultivo sin auxina, pero los brotes en los medios de cultivo con 0.5 ó 1 mg L⁻¹ AIB formaron más raíces y las plantas fueron más grandes. El medio de cultivo con las sales inorgánicas a 66% fue mejor condición que las sales a 100% para que los brotes formaran más raíces. Las plantas obtenidas de cultivos *in vitro* incubados en invernadero y laboratorio tuvieron en promedio 7.1 y 6.5 hojas, 7 y 6.5 mm de diámetro de tallo 170 y 150 mg de peso seco total, respectivamente.

Abstract

In Oaxaca the *Agave Americana* var. oaxacensis is found wild and small plantations. The objective of the study was to evaluate the concentration of indole butyric acid (IBA) and the inorganic salts in the culture medium, thus as the incubation temperature, its effect on the rooting of *Agave* shoots and plant characteristics. The worked was conducted in the laboratory of plant tissue culture and in a greenhouse from the Technological Institute of Oaxaca Valley in 2011-2012. Stem tissues cultured *in vitro* formed clusters of 4 to 10 adventitious shoots. Shoots with 4-4.5 cm were separated individually and to induce rooted, were transferred to containers of 145 cm³ with 20 mL of different culture medium. The total sprouts on each culture medium were separated into two groups for incubation during 60 days under different conditions of laboratory or greenhouse. All sprouts formed adventitious roots even in culture mediums without auxin but the shoots in culture medium with 0.5 or 1 mg L⁻¹ IBA formed more roots and the plants were larger. The culture medium containing inorganic salts to 66%, gave better condition, than the salts to 100%, for shoots producing more roots. The plants obtained *in vitro* cultures incubated in greenhouse and laboratory had on average 7.1 and 6.5 leaves, 7 and 6.5 mm in stem diameter, 170 and 150 mg of total dry weight, respectively.

* Recibido: octubre de 2012
Aceptado: febrero de 2013

Palabras clave: *Agave americana*, auxina, micropropagación, raíces adventicias,

Key words: *Agave americana*, auxin, micropropagation, adventitious roots,

Introducción

En México, diversas especies de agaves se han usado ampliamente para delimitar terrenos, elaborar artículos de fibra, obtención de azúcares y la elaboración de bebidas fermentadas y destiladas (Bautista-Justo *et al.*, 2001). En Oaxaca, México durante 2006 existían más de 11 000 ha de plantaciones en las que se utilizó preferentemente el *A. angustifolia* Haw (Bravo *et al.*, 2007) que al compararla con el *A. americana* variedad *oaxacensis* se tiene que: 1) la parte central de la roseta llamada piña de plantas adultas de ambas especies contienen similar cantidad de azúcares, por unidad de peso; 2) la piña de la primer especie pesa de 70 a 110 kg y la del *A. americana* variedad *oaxacensis* es ligeramente más grande; y 3) los individuos de la primer especie tardan de 7 a 9 años en llegar a la madurez, mientras que la segunda tarda de 18 a 20 años y esta ha sido una causa de que se privilegie establecer plantaciones con la primer especie, mientras que a la segunda se le propaga y cultiva en reducidas extensiones (Guillot y Meer, 2004; Valenzuela, 2003). Sin embargo, diversos grupos de agricultores muestran interés para que el *A. americana* variedad *oaxacensis* sea propagado y establecerlo en plantaciones, por lo que se propone la micropropagación *in vitro* para obtener gran cantidad de plantas en un corto plazo.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales se puede usar para el rescate y la conservación de especies amenazadas y también para la multiplicación a gran escala de genotipos superiores, y obtener grandes poblaciones clonales a partir de plantas seleccionadas. Se ha realizado la micropropagación de *Agave fourcroydes* (Madrigal *et al.*, 1990), *A. cocui* Trelease (Salazar *et al.*, 2009); *A. karwinskii*, y *A. potatorum* (Domínguez *et al.*, 2008). En Oaxaca, México, durante el periodo 1988 a 2005 el *A. angustifolia* se propagó mediante el cultivo de tejidos, las plantas obtenidas se aclimatizaron en invernadero durante 70 días, crecieron durante 10 a 12 meses en vivero y más de 100 mil plantas se establecieron en campo (Enriquez del Valle, 2008; Enriquez del Valle *et al.*, 2009).

Es posible hacer modificaciones en cada una de las etapas de un procedimiento de propagación *in vitro* para incrementar la eficiencia de éste y la calidad de las plantas, por lo que es conveniente evaluar el efecto de variar la concentración de los componentes de un medio de cultivo como las sales

Introduction

In Mexico, several species of agave have been widely used to delimit fields, make articles of fiber, sugars and processing of fermented and distilled beverages (Bautista-Justo *et al.*, 2001). In Oaxaca, Mexico in 2006 there were more than 11000 ha of plantations in which were preferably used *A. angustifolia* Haw (Bravo *et al.*, 2007) that compared with *A. americana* var. *oaxacensis* has: 1) the central part of the rosette called *piña* from adult plants of both species contain similar amount of sugars, per unit weight, 2) the *piña* of the first specie weighs 70 to 110 kg and *A. americana*, var. *oaxacensis* is slightly larger, and 3) the individuals of the first specie take 7 to 9 years to reach maturity, while the second takes from 18 to 20 years and this has been a reason to establish plantations of the first specie, while the second was propagated and grown in small areas (Valenzuela, 2003; Guillot and Meer, 2004). However, several groups of farmers show interest for the *A. americana* var. *oaxacensis* to be spread and establish in plantations, so it is proposed *in vitro* micropropagation to obtain large numbers of plants in a short term.

In vitro culture of plant cells and tissues can be used to rescue and conservation of endangered species and also for large-scale multiplication of superior genotypes, and to obtain big clonal populations from selected plants. Micropropagation of *Agave fourcroydes* (Madrigal *et al.*, 1990), *A. cocui* Trelease (Salazar *et al.*, 2009), *A. karwinskii*, and *A. potatorum* (Domínguez *et al.*, 2008) has been made. In Oaxaca, Mexico, during the period 1988-2005 the *A. angustifolia* was propagated by tissue culture, the plants obtained were acclimatized in a greenhouse for 70 days, grown for 10 to 12 months in the nursery and over 100 thousand plants were established in the field (Enriquez del Valle, 2008; Enriquez del Valle *et al.*, 2009).

Modifications can be made in each of the steps of a procedure for *in vitro* propagation to increase the efficiency of this and the quality of the plants, so it is advisable to evaluate the effect of varying the concentration of the components of a culture medium such as mineral salts of Murashige and Skoog (1962) and exogenous application of growth regulators including auxins, such as indole-3-acetic

minerales de Murashige y Skoog (1962) y la aplicación exógena de reguladores de crecimiento en que se incluyen las auxinas, como los ácidos indol-3-acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) que inducen en los brotes de gran número de especies la formación de raíces adventicias, así como mayor tamaño de los brotes mediante el crecimiento de las células (Gilroy y Trewavas, 2001; Soto *et al.*, 2006).

Enríquez del Valle *et al.* (2005), mostraron que brotes de *Agave angustifolia* establecidos en medios de cultivo con 0.75 y 1 mg L⁻¹ de AIB formaron 6.8 y 7.6 raíces adventicias en promedio, además, los brotes formaron más raíces adventicias y más largas conforme se disminuyó de 100 a 50% la concentración de sales inorgánicas en el medio de cultivo.

En algunos esquemas de micropropagación de banano *Musa*, se ha propuesto que los cultivos *in vitro* en la etapa de enraizado de brotes para su preparación para trasplante a suelo, se coloquen durante un mes en condiciones de invernadero, esto como un procedimiento de pre adaptación en que las plantas obtenidas desarrollan mayor vigor, pigmentación, actividad fotosintética, desarrollo de la cutícula cerosa, características que capacitan a las plantas para adaptarse mejor que las plantas de cultivos *in vitro* incubados todo el tiempo en ambiente de laboratorio, cuando se transfieren de *in vitro* a contenedores con sustrato (Teixeira da Silva *et al.*, 2005). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la concentración del ácido indolbutírico (AIB) y de las sales inorgánicas en el medio de cultivo, así como el ambiente de incubación, en su efecto sobre la formación de raíces adventicias en brotes y las características de las plantas de *Agave americana* variedad oaxacensis.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales y un invernadero del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, en Xoxocotlán, Oaxaca, en las coordenadas geográficas de 17° 04' de latitud norte, 96° 46' de longitud oeste y 1550 msnm (INEGI, 2005), con material vegetal colectado en la Comunidad de Santa Catarina Minas Ocotlán, ubicada en los Valles Centrales, del estado de Oaxaca.

Explantos de tejido de tallo de *A. americana* var. oaxacensis se establecieron en frascos de 145 cm³ que contenían 20 mL de medio de cultivo con consistencia de gel, preparado con

ácido (IAA), naphthalene acetic acid (NAA) and indole butyric acid (IBA) that induce in buds of many species the formation of adventitious roots, thus as larger size of shoots by growing cells (Gilroy and Trewavas, 2001; Soto *et al.*, 2006).

Enriquez del Valle *et al.* (2005) showed that shoots of *Agave angustifolia* established in culture medium with 0.75 and 1 mg L⁻¹ of IBA formed 6.8 and 7.6 adventitious roots on average, also the shoots formed more adventitious roots and longer as decreased from 100 to 50% the concentration of inorganic salt in the culture medium.

In some schemes of micropropagation of *Musa*, has been proposed that *in vitro* cultures during the stage of rooting shoots, before its transplanting to soil, are placed for a month in greenhouse conditions; this as a pre adaptation procedure in which the obtained plants develop more vigor, pigmentation, photosynthetic activity, waxy cuticle development, characteristics that enable plants to better adapt than plants from *in vitro* culture, incubated the whole time under laboratory conditions, when are transferred from *in vitro* to pots with substrate (Teixeira da Silva *et al.*, 2005). Therefore, the objective of this study was to evaluate the concentration of indole butyric acid (IBA) and the inorganic salts in the culture medium, thus the incubation temperature and its effect on the formation of adventitious roots in shoots and characteristics of plants of *Agave americana* var. oaxacensis.

Materials and methods

The research was conducted in the laboratory of plant tissue cultures and in greenhouse of the Technological Institute of Oaxaca Valley in Xoxocotlán, Oaxaca, in the geographical coordinates 17° 04'N, 96° 46'W, 1 550 masl (INEGI, 2005), with plant material collected in the community of Santa Catarina Minas Ocotlán, located in the Central Valleys of Oaxaca.

Stem tissue explants of *A. americana* var. oaxacensis were established in flasks of 145 cm³ containing 20 mL of culture medium in gel, prepared with mineral salts of Murashige and Skoog (1962) (MS), 0.4 mg L⁻¹ thiamine, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 30 g L⁻¹ sucrose and 1 mg L⁻¹ benzyladenine. The pH was adjusted to 5.8 before adding 5.4 g L⁻¹ agar. The cultures were incubated for eight weeks under white

las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) (MS), 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo- inositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 1 mg L⁻¹ de benciladenina. El pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.4 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se incubaron durante ocho semanas bajo luz fluorescente blanca a 100 um m² s⁻¹ de intensidad, fotoperiodos de 16 h y 8 h de oscuridad, temperatura en el rango de 22-28 °C. En el transcurso de ocho semanas de incubación se formaron racimos de 4 a 10 brotes adventicios en cada explanto. Para la multiplicación de propágulos, los racimos de brotes que se formaron en cada explante se separaban en racimos de dos a tres brotes y se transfirieron a un medio de cultivo y condiciones de incubación similares que en el subcultivo anterior.

Al término de un ciclo de multiplicación de propágulos se formaron racimos de 4 a 10 nuevos brotes heterogéneos en tamaño. De éstos racimos de brotes se seleccionaron aquellos brotes que tenían de 4 a 4.5 cm de longitud, los que se separaron individualmente y transfirieron a frascos de 160 cm³ que contenían 25 mL de medio de cultivo para inducir su enraizado. Los diversos medios de cultivo se prepararon con: 1) agua destilada, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo- inositol, 25 g L⁻¹ de sacarosa; 2) sales minerales de Murashige y Skoog (1962) en tres concentraciones diferentes (33, 66 y 100%); y 3) auxina ácido indolbutírico (AIB) en cinco concentraciones diferentes (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 mg L⁻¹).

El total de brotes en frascos con cada medio de cultivo se separaron en dos grupos para incubarlos durante 60 días en condiciones diferentes: 1) de laboratorio (iluminación fluorescente blanca, a 100 umol m⁻² s⁻¹, fotoperiodos de 16 h y 8 h de oscuridad, temperatura de 22-28 °C) y 2) en invernadero, donde los cultivos estuvieron expuestos a radiación solar disminuida 50% mediante malla sombra.

El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 3 x 5 x 2 (concentración de sales inorgánicas, concentración de AIB, ambiente de incubación) por lo que se tuvieron 30 tratamientos. La unidad experimental fue un brote en cada frasco de cultivo y se tuvieron 12 repeticiones por tratamiento. Al término del periodo de incubación, se tomaron al azar ocho unidades experimentales de cada tratamiento para cuantificar número de hojas, área foliar (cm²) altura de la planta (cm), diámetro de tallo (mm), número de raíces, longitud de la raíz más larga (cm), volumen de la raíz (cm³), materia seca total de la planta (mg). Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

fluorescent light at 100 um m² s⁻¹ of intensity, photoperiod of 16 h and 8 h dark, temperature in the range of 22-28 °C. In the course of eight weeks of incubation clusters formed of 4 to 10 adventitious shoots in each explant. To multiply propagules, clusters formed in each explant were separated into clusters of two to three shoots and transferred to a culture medium and incubated in similar conditions that in the previous subculture.

At the end of a cycle of propagules multiplication were formed clusters of 4-10 new shoots heterogeneous in size. From this clusters of shoots were selected those shoots that had 4 to 4.5 cm in length, which were individually separated and transferred to flasks of 160 cm³ containing 25 mL of culture medium to induce rooting. The various culture medium were prepared with: 1) distilled water, 0.4 mg L⁻¹ thiamine, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 25 g L⁻¹ sucrose; 2) mineral salts Murashige and Skoog (1962) in three different concentrations (33, 66 and 100%); and 3) auxin indole butyric acid (IBA) in five different concentrations (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg L⁻¹).

All shoots in flasks with each culture medium were separated into two groups to be incubated for 60 days under different conditions: 1) laboratory (white fluorescent light, 100 umol m⁻² s⁻¹, photoperiod of 16 h and 8 h of dark, temperature from 22-28 °C) and 2) in greenhouse, where cultures were exposed to solar radiation decreased 50% by shade cloth.

The experiment was established according to a completely randomized design with factorial array 3 x 5 x 2 (concentration of inorganic salts, IBA concentration, incubation temperature) so it had 30 treatments. The experimental unit was shoot in each culture flask and had 12 replicates; at the end of the incubation period, eight experimental units were randomly taken from each treatment to quantify number of leaves, leaf area (cm²), plant height (cm), stem diameter (mm), number of roots, length of longest root (cm), root volume (cm³), total dry matter of the plant (mg). Data were subjected to analysis of variance and comparison of means (Tukey, $\alpha= .05$).

Results and discussion

Shoots established in various culture mediums at varying concentrations of inorganic salts and IBA, were incubated under laboratory and greenhouse conditions; after 12 days

Resultados y discusión

Los brotes establecidos en diversos medios de cultivo que variaban en concentración de sales inorgánicas y AIB, se incubaron en condiciones de laboratorio y otros se incubaron en invernadero; transcurridos 12 días de incubación todos los brotes ya presentaban raíces adventicias. Enríquez del Valle *et al.* (2005) indican que se han utilizado medios de cultivo con bajas concentraciones de sales inorgánicas (MS) y ácido indolbutírico (AIB) para propiciar la formación de raíces adventicias en diferentes especies de agave cultivadas *in vitro*.

Transcurridos 60 días de que los brotes de *Agave americana* se establecieron en las diferentes condiciones de cultivo, los análisis de varianza mostraron que las concentraciones de sales minerales en el medio de cultivo tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) de efecto en número de raíces adventicias que formaron los brotes, longitud de la raíz y volumen de raíz, así como en el número de hojas que tuvieron estas plantas. Las distintas concentraciones de la auxina AIB en el medio de cultivo tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) de efecto en todas las variables (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Análisis de varianza de las características de plantas de *Agave americana* variedad oaxacensis obtenidas *in vitro* a partir de brotes enraizados.

Table 1. Analysis of variance of characteristics of plants *Agave americana* var. oaxacensis obtained *in vitro* from rooted shoots.

F V	Gl	Cuadros medios y significancia			
		AP	NH	DT	AF
AIB	4	19.89**	15.01**	0.069**	76180.47**
S	2	3.20ns	3.41**	0.006ns	18899.66ns
A	1	66.67**	21.60**	0.166**	59587.42**
AIB+S	8	14.64**	1.61**	0.148**	39617.69**
AIB+A	4	3.34ns	2.06*	0.008ns	62722.60**
S+A	2	0.16ns	1.73ns	0.010ns	43479.46**
AIB+S+A	8	1.70ns	3.80**	0.097**	46333.60**
Error	207	2.48	0.93	0.0065	6996.15
Total	236				

FV= fuentes de variación; Gl= grados de libertad; AP= altura de la planta; NH= número de hojas; DT= diámetro del tallo; AF= área foliar; Trat= tratamientos; AIB= ácido indolbutírico; S= sales; A= ambiente de incubación; AIB+S= interacción ácido indolbutírico+sales; AIB+A= interacción ácido indolbutírico+ambiente de incubación; S+A= interacción sales+ambiente de incubación; AIB+S+A= interacción ácido indolbutírico+sales+ambiente de incubación; *= valor de F, significativo ($p < 0.05$); **= valor de F, altamente significativo ($p \leq 0.01$); ns= valor de F, no significativo ($p > 0.05$).

of incubation, all shoots had adventitious roots. Enríquez del Valle *et al.* (2005) indicate that they have used culture medium with low concentrations of inorganic salts (MS) and indole butyric acid (IBA) to promote the formation of adventitious roots in different species of agave grown *in vitro*.

After 60 days that the shoots of *Agave americana* were established in the different culture conditions, analysis of variance showed that the concentrations of mineral salts in the culture medium had significant differences ($p \leq 0.01$) effect on number of adventitious roots that formed shoots, root length and root volume, thus as in the number of leaflets that had these plants. The different concentrations of auxin IBA in the culture medium had significant differences ($p \leq 0.01$) effect on all variables (Tables 1 and 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza de las características de plantas de *Agave americana* variedad oaxacensis obtenidas *in vitro* a partir de brotes enraizados.

Table 2. Analysis of variance of characteristics of plants *Agave americana* var. oaxacensis obtained *in vitro* from rooted shoots.

F V	Gl	Cuadros medios y significancia			
		PST	NR	LR	VR
AIB	4	0.076**	25.85**	66.59**	0.11**
S	2	0.007ns	25.13**	7.91**	0.22**
A	1	0.018*	0.37ns	2.05ns	0.38**
AIB+S	8	0.012**	17.21**	57.48**	0.07**
AIB+A	4	0.013**	5.73*	9.52**	0.05**
S+A	2	0.002ns	2.24ns	3.43ns	0.08**
AIB+S+A	8	0.009*	15.07**	8.84**	0.01**
Error	207	0.003	2.20	1.55	0.004

FV= fuentes de variación; Gl= grados de libertad; PST= peso seco total; NR= número de raíces; LR= longitud de la raíz; VR= volumen de raíz; Trat= tratamientos; AIB= ácido indolbutírico; S= sales; A= ambiente de incubación; AIB+S= interacción ácido indolbutírico+sales; AIB+A= interacción ácido indolbutírico+ambiente de incubación; S+A= interacción sales+ambiente de incubación; AIB+S+A= interacción ácido indolbutírico+sales+ambiente de incubación; *= valor de F, significativo ($p < 0.05$); **= valor de F, altamente significativo ($p \leq 0.01$); ns= valor de F, no significativo ($p > 0.05$).

The interaction of mineral salts and indole butyric acid had significant effect ($p \leq 0.01$) in all variables. Incubation environments had significant differences ($p \leq 0.01$) effect on plant height, leaf number, stem diameter, leaf area, root volume and significant effect ($p \leq 0.05$) in total dry weight (Tables 1 and 2).

La interacción de las sales minerales y ácido indolbutírico tuvo efecto significativo ($p \leq 0.01$) en todas las variables. Los ambientes de incubación tuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) de efecto en altura de la planta, número de hojas, diámetro de tallo, área foliar, volumen de raíz y efecto significativo ($p \leq 0.05$) en peso seco total (Cuadros 1 y 2).

La interacción entre el ambiente de incubación y las dosis de ácido indolbutírico en el medio de cultivo tuvo efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) en el área foliar, peso seco total, longitud de la raíz y volumen de la raíz, y efecto significativo ($p \leq 0.05$) para el número de hojas y número de raíces. La interacción entre la concentración de sales minerales en el medio de cultivo y ambiente de incubación tuvo efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) en el área foliar y volumen de raíz. La interacción entre el ambiente de incubación, la concentración de sales minerales y la concentración de ácido indolbutírico en el medio de cultivo, tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en número de hojas, diámetro de tallo, área foliar, número de raíces, volumen de la raíz, y longitud de la raíz, siendo significativo ($p \leq 0.05$) para peso seco total (Cuadro 1 y 2).

Los medios de cultivo con 1 ó 2 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico influyeron para que los brotes dieran origen a plantas que alcanzaron mayor altura, número de hojas y área foliar. Mientras que para las variables diámetro de tallo y volumen de raíz fue únicamente la concentración de 1 mg L⁻¹ de AIB. Todos los brotes formaron raíces adventicias, incluso aquellos establecidos en medios sin auxina, los cuales tuvieron 7.1 raíces. Así también Blanco y Valverde (2004) mencionan que brotes de *Philodendron* spp. no requirieron la aplicación exógena de reguladores de crecimiento para que formaran raíces adventicias (Cuadro 3). Lo anterior pudo ocurrir, debido a que en las hojas ocurre la síntesis de auxinas (Raven *et al.*, 1999; Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Los brotes establecidos en medios de cultivo sin AIB formaron la menor cantidad (7.1) de raíces adventicias, que tuvieron 0.47 cm³ de volumen y la mayor longitud (9.5 cm). Conforme se aplicaron concentraciones crecientes de AIB hasta 0.5 mg L⁻¹ los brotes formaron significativamente (Tukey, 0.05) la mayor cantidad de raíces (8.2). Los brotes establecidos en medios con concentraciones de AIB superior a 0.5 mg L⁻¹ mostraron la tendencia a formar menor cantidad de raíces adventicias y significativamente (Tukey, 0.05) más cortas (Cuadro 3).

The interaction between incubation environment and doses of IBA in the culture medium was highly significant ($p \leq 0.01$) in the leaf area, total dry weight, root length and root volume, and significant effect ($p \leq 0.05$) for the number of leaves and number of roots. The interaction between the concentration of mineral salts in the culture medium and the incubation environment was highly significant ($p \leq 0.01$) in leaf area and root volume. The interaction between the incubation environment, the concentration of mineral salts and IBA concentration in the culture medium, had highly significant effects ($p \leq 0.01$) in the number of leaves, stem diameter, leaf area, number of roots, root volume and root length, being significant ($p \leq 0.05$) for total dry weight (Table 1 and 2).

Culture medium with 1 or 2 mg L⁻¹ IBA influenced shoots to give rise to plants that reached greater height, leaf number and leaf area. While for variables stem diameter and root volume was only the concentration of 1 mg L⁻¹ of IBA. All shoots formed adventitious roots, including those established in mediums without auxin, which had 7.1 roots. Also Blanco and Valverde (2004) mention that shoots of *Philodendron* spp. did not require exogenous application of growth regulators to form adventitious roots (Table 3). This could occur because in leaves occur the auxin synthesis (Raven *et al.* 1999; Azcon-Bieto and Heel, 2000).

Shoots established in culture media without IBA formed the lowest amount (7.1) of adventitious roots, which had 0.47 cm³ of volume and the greatest length (9.5 cm). As increasing concentration of IBA up to 0.5 mg L⁻¹, shoots formed significantly (Tukey, 0.05) the largest amount of root (8.2). Shoots established in mediums with IBA concentrations higher than 0.5 mg L⁻¹ showed a tendency to form lesser adventitious roots and significantly (Tukey, 0.05) shorter (Table 3).

Shoots established in culture medium containing mineral salts to 66% concentration formed 7.9 adventitious roots, amount 15% higher and significantly (Tukey, 0.05) different to the amount of roots formed by shoots in culture medium containing inorganic salts to 100%. Meanwhile Enriquez del Valle *et al.* (2005) indicate that shoots *Agave angustifolia* formed 4.7 adventitious roots in culture medium containing inorganic salts at 50% concentration without phytohormones but when incorporating 1 mg L⁻¹ of IBA in the culture medium the shoots formed 8.5 roots (Table 3).

Cuadro 3. Características de plantas en función de niveles de factores principales.
Table 3. Plant characteristics based on levels of major factors.

Factores	Características de las plantas							
	AP (cm)	NH	DT (cm)	AF (cm ²)	PST (g)	NR	LR (cm)	VR (cm ³)
AIB (mg L ⁻¹)								
0	9.6 c	6.2 d	0.64 b	301.9 bc	0.11 d	7.16 bc	9.57 a	0.47 c
0.5	10.4 bc	6.4 cd	0.67 b	260.67 c	0.14 cd	8.25 a	9.39 a	0.52 b
1.0	11.4 a	7.3 ab	0.74 a	335.91ab	0.17 b	7.95 ab	8.46 b	0.57 a
1.5	10.7 ab	6.9 bc	0.67 b	316.65 b	0.16 bc	6.53 c	8.54 b	0.45 c
2.0	10.9 ab	7.4 a	0.65 b	367.92 a	0.22 a	6.80 c	6.56 c	0.47 c
Sales MS (%)								
33	10.52 a	6.88 ab	0.66 a	305.40 a	0.17 a	7.15 b	8.25 b	0.44b
66	10.87 a	6.66 b	0.68 a	334.14 a	0.15 a	7.98 a	8.87 a	0.52 a
100	10.52 a	7.07 a	0.67 a	310.32 a	0.16 a	6.91 b	8.44 ab	0.53 a
Ambiente de incubación								
Lab	11.17 a	6.57 b	0.65 b	332.38 a	0.15 b	7.30 a	8.61 a	0.46 b
Inv	10.11 b	7.17 a	0.70 a	300.86 b	0.17 a	7.39 a	8.43 a	0.54 a

AIB=ácido indolbutírico; AP=altura de la planta; NH=número de hojas; DT=diámetro de tallo; AF=área foliar; PST=peso seco total; NR=número de raíces; LR=longitud de la raíz; VR=volumen de raíz; Lab=laboratorio; Inv=invernadero; promedios con la misma letra, no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Los brotes establecidos en medio de cultivo con las sales minerales a 66% de concentración formaron 7.9 raíces adventicias, cantidad 15% superior y significativamente (Tukey, 0.05) diferente a la cantidad de raíces que formaron los brotes en medios de cultivo con las sales inorgánicas a 100%. Por su parte Enríquez del Valle *et al.* (2005) indican que brotes de *Agave angustifolia* formaron 4.7 raíces adventicias en el medio de cultivo con las sales inorgánicas al 50% de concentración y sin fitohormonas aunque al incorporarles 1 mg L⁻¹ de AIB en el medio de cultivo los brotes formaron 8.5 raíces (Cuadro 3).

Las plantas originadas de brotes incubados en laboratorio alcanzaron en promedio significativamente (Tukey, 0.05) mayor altura en comparación a las plantas incubadas en el invernadero. Mientras que las plantas originadas de los brotes incubados en invernadero tuvieron significativamente (Tukey, 0.05) mayor cantidad de hojas, diámetro de tallo, peso seco de tallo y volumen de raíz, que las plantas originadas en laboratorio (Cuadro 3), esto se explica con lo investigado por Papaphotiou *et al.* (2003) en plantas de *Callistemon* sp. micropropagadas y aclimatizadas en condiciones de invernadero con 50% sombra e indican que el nivel de irradiancia fue un factor ambiental importante que influyó en el fenotipo de las plantas. Pospíšilová *et al.* (2007) mencionan que durante la aclimatación en invernadero de plantas micropropagadas se usan niveles de irradiancia en el rango de 50-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Plants originated from shoots incubated in laboratory reached on average, significantly (Tukey, 0.05) greater height compared to plants incubated in the greenhouse. While plants originated from shoots incubated in greenhouse had significantly (Tukey, 0.05) higher number of leaves, stem diameter, dry weight of stems and root volume, than plants originated in the laboratory (Table 3); this is explained by findings from Papaphotiou *et al.* (2003) in micropropagated and acclimatized plants of *Callistemon* sp. in a greenhouse with 50% shade and indicate that the irradiance level was an important environmental factor influencing the phenotype of plants. Pospíšilová *et al.* (2007) mention that during acclimatization in greenhouse micropropagated plants use different levels of irradiance in the range of 50-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

The significant effect of the interaction on root formation on the shoots could be interpreted that, even though the auxin plays an important role in inducing adventitious root formation, other environmental conditions, such as concentration of salts in the culture medium, quality and intensity of illumination influence the ability of the plant material response to stimulation of the growth regulator. So that the culture medium with 66% inorganic salts, 0.5 mg L⁻¹ IBA and incubation environment in a greenhouse was an appropriate condition for rooting of shoots of *Agave* and preparation for transplantation to soil. The plants obtained in this condition had 10.2 cm height, 7.2 leaves,

El efecto significativo de las interacciones sobre la formación de raíces en los brotes se podría interpretar en que, aun cuando la auxina desempeña un papel importante para inducir la formación de raíces adventicias, otras condiciones ambientales, tales como la concentración de sales en el medio de cultivo y la calidad e intensidad de iluminación influyen en la capacidad de respuesta del material vegetal al estímulo del regulador de crecimiento. De tal manera que el medio de cultivo con 66% sales inorgánicas, 0.5 mg L⁻¹ de AIB y ambiente de incubación en invernadero fue una condición apropiada para el enraizado de los brotes de *Agave* y su preparación para trasplante a suelo. Las plantas obtenidas en dicha condición tuvieron 10.2 cm de altura, 7.2 hojas, 307.43 cm² de área foliar, su tallo de 0.7037 cm de diámetro, 10.2 raíces adventicias de 7.8 cm de longitud y 0.737 cm³ de volumen; su peso seco total fue de 160.87 mg.

De manera similar a la formación de raíces en los brotes de *A. americana* var. *oaxacensis*, se ha comprobado que brotes de *Paulownia elongata* (Castellanos *et al.*, 2006) formaron raíces adventicias cuando se establecieron en medio de cultivo sin auxina, y ya que se conoce que las auxinas son reguladores de crecimiento que inducen la formación de raíces adventicias, lo anterior sugiere que en los brotes ocurrió la síntesis de esta sustancia. Pero los brotes que se establecieron en medios con las dosis menores de auxina formaron mayor cantidad de raíces y en menor tiempo, lo cual sugiere que la auxina exógena fue complementaria a la auxina endógena para estimular una respuesta de formación de raíces cercana al óptimo. Así también las dosis mayores de auxina exógena superaron el nivel necesario para la respuesta óptima y causaron inhibición parcial.

Las plantas provenientes de cultivos *in vitro* incubadas en invernadero contrastaron en diversas características morfológicas, respecto a las plantas originadas de cultivos *in vitro* incubadas en laboratorio. Es necesario conocer si las características morfológicas que presentaron estas plantas micropropagadas corresponden a una condición de pre-aclimatación que sea conveniente para incrementar el porcentaje de plantas que sobrevivan en el trasplante a condiciones *ex vitro* y su crecimiento en invernadero o campo (Debergh y Read, 1991; Cui *et al.*, 2000; Pospíšilová *et al.*, 2000).

307.43 cm² leaf area, stem diameter 0.7037 cm, 10.2 adventitious roots of 7.8 cm length and 0.737 cm³ volume, total dry weight was 160.87 mg.

Similarly to the formation of roots in shoots of *A. americana* var. *oaxacensis*, it has been proven that shoots of *Paulownia elongata* (Castellanos *et al.*, 2006) formed adventitious roots when were established in the culture medium without auxin, and since it is known that auxins are growth regulators which induce the formation of adventitious roots, this suggests that in shoots occurred the synthesis of this substance. But shoots that were established on mediums with lower doses of auxin formed higher amount of roots in less time, suggesting that the exogenous auxin was complementary to the endogenous auxin to stimulate a response of root formation close to the optimum. Also higher doses of exogenous auxin exceeded the level required for optimum response and caused partial inhibition.

Plants from *in vitro* cultures incubated in greenhouse contrasted in various morphological traits, regarding plants grown *in vitro* cultures incubated in the laboratory. Is necessary to know, if the morphological traits that this micropropagated plants presented correspond to a pre-acclimatization condition; is convenient to increase the percentage of plants that survive during transplantation to *ex vitro* conditions and its growth in greenhouse or field (Debergh and Read, 1991; Cui *et al.* 2000; Pospíšilová *et al.*, 2000).

Conclusions

Indole butyric acid in concentrations of 0.5 or 1 mg L⁻¹ in culture medium stimulated in shoots, highest formation of adventitious roots and plant height, compared to shoots established in medium without IBA. In culture medium the inorganic salts MS at 66% concentration, was a condition that was supplemented with auxin in its effect on the shoots formed higher amounts of adventitious roots. Shoots incubated in greenhouse environment developed more leaves, stems of larger diameter and accumulated more total dry matter, but similar amount of roots than shoots incubated in the laboratory.

End of the English version



Conclusiones

El ácido indolbutírico en concentraciones de 0.5 ó 1 mg L⁻¹ en el medio de cultivo estimuló en los brotes la formación de mayor cantidad de raíces adventicias y altura de la planta, en comparación a brotes establecidos en medios sin AIB. En el medio de cultivo las sales inorgánicas MS al 66% de concentración fue una condición que se complementó con la auxina en su efecto para que los brotes formaran mayor cantidad de raíces adventicias. Los brotes incubados en ambiente de invernadero desarrollaron más hojas, tallos de diámetro mayor y acumularon más materia seca total, pero similar cantidad de raíces que los brotes incubados en ambiente de laboratorio.

Literatura citada

- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, España. 522 p.
- Bautista-Justo, M.; García-Oropeza, L.; Barboza-Corona, J. E. y Parra-Negrete, L. A. 2001(b). El *Agave tequilana* Weber y la producción de tequila. Acta Universitaria. 11(2):26-34.
- Blanco, M. y Valverde R. 2004. Micropropagación de *Philodendro* sp. Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica, San José Costa Rica 28(1):39-46.
- Bravo, M. E.; Arredondo, C. y Espinosa, H. 2007. Tecnología para la producción de maguey mezcalero en Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Libro técnico 7:160.
- Castellanos, H. O. A.; Rodríguez, S. A.; Rodríguez, D. J. M. y Rodríguez, G. B. 2006. Organogénesis indirecta y enraizamiento *in vitro* de *Paulowniaelongata*. e-Gnosis 4(15):1-12 p.
- Cui, Y.; Hahn, E.; Kozai, T. and Paek, K. 2000. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmanniaglutinosa* plantlets *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 62:219-226.
- Debergh, P. C. and Read, P. E. 1991. Micropropagación. In: micropropagación technology and application. Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman. (Eds.). Kluwer Academic Publisher. USA. 1-13.
- Domínguez, R. M. S.; González, J. M. L.; Rosales, G. C.; Quilloñes, V. C.; Delgadillo, D. L. S.; Mireles, O. J. y Pérez, M. B. E. 2008 (a). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Aguascalientes, México. 16(41):53-62.
- Enríquez del Valle, J. R.; Carrillo-Castañeda, G. y Rodríguez de la O, J. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Rev. Fitotec. Mex. 28:175-178.
- Enríquez del Valle, J. R. 2008. La propagación y crecimiento de *Agaves*. Fundación Produce Oaxaca A. C. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 pp.
- Enríquez del Valle, J. R.; Velasco, V. A.; Campos, G. V.; Hernández-Gallardo, A. E. and Rodríguez-Mendoza, M. N. 2009. *Agave angustifolia* plants grow with different fertigation doses and organic substrates. Acta Hort. 843:49-55.
- Gilroy, S. and Trewavas, A. J. 2001. Signal processing and transduction in plant cells: the end of the beginning? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:307-314.
- Guillot-Ortiz, D. and Meer, P. V. D. 2004. *Agave americana* var. *oaxacensis* and the icon of Valentini (1719). Bot. Complut. 28:101-103.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2005. Principales resultados por localidad. II conteo de población y vivienda. World wide Web Electrónica publicación. <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/esmand/conteo2005/iter2005/selentcampo.aspx>.
- Madrigal L. R.; Pineda, F. E. and Rodríguez de la O, J. L. 1990. *Agave*. In: handbook of plant cell culture. Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. and Bajaj, Y. P. S. (Eds.) McGraw-Hill Publishing Company. New York, USA. (5):206-227.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.
- Pierick, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 325 p.
- Papaphotiou, M.; Hatzilazarou, S.; Syros, T.; Economou, A. and Sovatzoglou, G. 2003. Acclimatization of *Callistemon* sp. microplants in fog as influenced by shading. Acta Hort. 616:151-155.
- Pospíšilová, J., Haisel, D., Synková, H., Čatský, J., Wilhelmová, N., Plzánková, Š., Procházková, D., and Šrámek, F. 2000. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. Plant Cell Tissue Organ Cult. 61:125-133.
- Pospíšilová, J.; Synková, H.; Haisel, D. and Semorádová, Š. 2007. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a Review). Acta Hort. 748:29-3.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. 1999. Biology of plants. 6^a (Ed). Freedman, W. H. and company worth Publishers. New York, U.S.A 944.
- Salazar, E.; González, P. y Hernández, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. Agron. Trop. 59(2):1-12.
- Soto, E. L.; Jasso, M. J.; Vargas, H. J. J.; González, R. H. y Cetina, A. V. M. 2006. Efecto de diferentes dosis de AIB sobre el enraizamiento de *Ficus benjamina* L. en diferentes épocas del año. Rev. Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. 2(3):795-814.
- Teixeira da Silva, J. A., Dam, D. T. G. and Tanaka, M. 2005. *In vitro* acclimatización of banana and *Cymbidium*. International J. Bot. 1(1):41-49.
- Valenzuela, Z. A. G. 2003. El *Agave* tequilero, cultivo e industria de México. 3^a (Ed.). Mundi-Prensa. México. D. F. 215 p.